



⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift  
⑯ DE 41 18 440 A 1

⑯ Int. Cl. 5:  
**C 12 Q 1/25**  
C 12 Q 1/61  
G 01 N 33/02  
// A23L 1/223

DE 41 18 440 A 1

⑯ Aktenzeichen: P 41 18 440,8  
⑯ Anmeldetag: 5. 6. 91  
⑯ Offenlegungstag: 10. 12. 92

⑯ Anmelder:  
Maier, Ursula, 7298 Loßburg, DE

⑯ Erfinder:  
gleich Anmelder

⑯ Vertreter:  
Grünecker, A., Dipl.-Ing.; Kinkelday, H., Dipl.-Ing.  
Dr.-Ing.; Stockmair, W., Dipl.-Ing. Dr.-Ing. Ae.E. Cal  
Tech; Schumann, K., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.; Jakob,  
P., Dipl.-Ing.; Bezold, G., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;  
Meister, W., Dipl.-Ing.; Hilgers, H., Dipl.-Ing.;  
Meyer-Plath, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Ehbold, A.,  
Dipl.-Ing.; Schuster, T., Dipl.-Phys.; Goldbach, K.,  
Dipl.-Ing. Dr.-Ing.; Aufenanger, M., Dipl.-Ing.;  
Klitzsch, G., Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000 München

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Bestimmung von Lipasen in Lebensmitteln

⑯ Es wird ein Verfahren zur Bestimmung von Lipaseaktivität  
in Lebensmitteln beschrieben, bei dem eine Lebensmittel-  
probe mit einer wässrigen Pufferlösung mit pH 5 bis 10,  
enthaltend ein nichtionisches Detergens, bei 25 bis 50°C für  
mindestens 30 min behandelt wird. Zum Herstellen einer  
klaren Lösung wird die Extraktionslösung gegebenenfalls  
von unlöslichen Rückständen befreit, dann wird der Extrakt-  
ionslösung ein Lipasesubstrat und ein Farbindikator zuge-  
setzt, die optische Dichte der so hergestellten Lösung wird  
bei einer Wellenlänge, die auf den verwendeten Farbindika-  
tor abgestimmt ist, gemessen, danach wird die Lösung für  
mindestens eine Stunde bei 25 bis 50°C inkubiert, und  
anschließend wird die optische Dichte der Lösung erneut  
gemessen. Aus der Differenz der optischen Dichte vor und  
nach Inkubation kann die in der Probe vorhandene Lipaseak-  
tivität berechnet werden.

DE 4118440 A 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Lipaseaktivität in Lebensmitteln.

In den vergangenen Jahren hat die Lebensmittelindustrie in immer stärker werdenden Ausmaße vorgefertigte Nahrungsmittel zur Verfügung gestellt, die über einen längeren Zeitraum haltbar sein sollen. Die Möglichkeit der langfristigen Lagerung wird jedoch beeinträchtigt durch Vorgänge in den zu lagерnden Nahrungsmitteln, die zum Verderb der Nahrungsmittel führen können. Eine Ursache des Verderbs ist mikrobiologischer Natur, wobei von Mikroorganismen hergestellte Enzyme, die bereits in den zur Nahrungsmittelherstellung verwendeten Lebensmitteln vorhanden sein können, während der Lagerung der Nahrungsmittel enzymatisch aktiv sein können und somit durch Abbau von Nahrungsmittelbestandteilen zu deren Verderb führen. Zu solchen Enzymen zählen Lipasen, die durch Lipolyse von Triglyceriden, einem Bestandteil zahlreicher Nahrungsmittel, zum Verderb von Nahrungsmitteln während der Lagerung beitragen.

Für die Lebensmittelindustrie ist es von Interesse, zu einem möglichst frühen Zeitpunkt bei der Nahrungsmittelherstellung festzustellen, bis zu welchem Ausmaße die für die Nahrungsmittelherstellung verwendeten Lebensmittel mit Lipaseaktivität belastet sind.

Aus dem Stand der Technik sind im wesentlichen zwei Verfahren zur Bestimmung von Lipasen in Lebensmitteln bekannt.

Die einfachste und schnellste Methode zum Nachweis von Lipaseaktivität erfolgt mit dem Esterase-Testpapier nach Purr, bei dem ein mit Indolacetat imprägniertes Papier mit der Analysenprobe in Kontakt gebracht wird. Dabei erfolgt bei der Anwesenheit von Lipasen die enzymatische Hydrolyse des Indolacetats, wobei Indoxyl gebildet wird, das wiederum durch Luftsauerstoff zu Indigoblau oxidiert wird. Die Blaufärbung des Papiers gilt als positiver Nachweis für das Vorhandensein von Lipaseaktivität. Dieser Test ist jedoch oftmals nicht ausreichend für den Nachweis geringer Lipaseaktivitäten, und weiterhin erlaubt er keinen quantitativen Nachweis von Lipaseaktivität.

Eine quantitative Bestimmung von Lipaseaktivitäten in Lebensmitteln, wie beschrieben in Haslebeck et al., 1985, Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -forschung, Bd. 181, Seiten 271 – 275, erfolgt durch fluorometrische Bestimmung von Methylumbelliferon, das aus einem Methylumbellifronester durch Lipaseaktivität in der untersuchten Probe freigesetzt wird. Dieser Nachweis über Fluoreszenz des durch Enzymaktivität gebildeten Produkts besitzt jedoch mehrere bedeutende Nachteile. Zum einen ist der Fluoreszenznachweis an sich relativ störanfällig, da andere Bestandteile des Testansatzes als das durch die Lipaseaktivität gebildete Methylumbelliferon durch Eigenfluoreszenz die Meßwerte verfälschen können. Weiterhin wird bei diesem Test zum Stoppen der Lipaseaktivität Trifluoressigsäure eingesetzt, die ihrerseits die Methylumbellifronfluoreszenz in erheblichem Maße reduziert, was wiederum die Empfindlichkeit des Tests nachteilig beeinflusst. Es sind ebenfalls zusätzliche Maßnahmen bei Proben mit einem Fettgehalt größer als 3% in der Trockenmasse notwendig, indem solche Proben vor der Analyse entfettet werden müssen. Ein weiterer Nachteil der Fluoreszenzbestimmung besteht in dem großen apparativen Aufwand, der zur Durchführung der Analyse notwendig ist.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Ver-

fahren zur Bestimmung von Lipaseaktivität in Lebensmitteln zur Verfügung zu stellen, das mit wenig Aufwand, kostengünstig schnell durchführbar und nicht störanfällig ist.

Diese Aufgabe wird erfahrungsgemäß gelöst durch ein Verfahren der eingangs genannten Art, umfassend die folgenden Schritte:

a) Behandeln einer Lebensmittelprobe mit einer wässrigen Lösung einer Puffersubstanz mit pH 5 bis 10, enthaltend ein nichtionisches Detergens, für mindestens 30 min bei 25 bis 50°C zum Extrahieren der Lipasen.

b) gegebenenfalls Abfiltrieren des unlöslichen Extraktionsrückstands zum Herstellen einer klaren Lösung.

c) Zusetzen eines Lipasesubstrats und eines Farbindikators zu der klaren Lösung aus Schritt a) bzw. b).

d) Messen der optischen Dichte der in Schritt c) hergestellten Lösung bei einer auf den verwendeten Farbindikator abgestimmten Wellenlänge zum Ermitteln des Leerwerts,

e) Inkubieren der in Schritt d) gemessenen Lösung bei 25 bis 50°C für mindestens 1 h zur Hydrolyse des in Schritt c) zugesetzten Substrats durch die in Schritt a) extrahierten Lipasen, und

f) Messen der optischen Dichte wie in Schritt d) zum Ermitteln der Lipaseaktivität.

Als Puffersubstanz für die Extraktionslösung in Schritt a) können die Natrium- und Kaliumsalze von Phosphorsäure, Essigsäure und Tetraborsäure sowie der organische Puffer Tris verwendet werden. Besonders bevorzugt ist Natriumtetraborat als Puffersubstanz. Die Konzentration der Puffersubstanz sollte vorzugsweise in einem Bereich von 5 mM bis 100 mM liegen. Ganz besonders bevorzugt ist eine Konzentration von 25 mM.

Der pH der Extraktionslösung in Schritt a) sollte vorzugsweise zwischen pH 8 und 9 liegen. Ganz besonders bevorzugt ist eine Lösung mit einem pH von 8,5.

Das zur Extraktion benötigte nichtionische Detergens kann beispielsweise ausgewählt werden aus Triton-X-100 und Tween 80, wobei Triton-X-100 besonders bevorzugt ist. Die Konzentration des Detergens sollte vorzugsweise 0,1 bis 5 Vol.-% der gesamten Extraktionslösung tragen. Besonders b vorzugsweise ist eine Konzentration des Detergents von 1 Vol.-%.

Vorzugsweise erfolgt die Extraktion der Lipasen innerhalb eines Zeitraums von ungefähr 1 h und vorzugsweise bei 30 bis 45°C, wobei 40°C besonders bevorzugt ist.

Enthält die Extraktionslösung nach Beendigung des Schritts a) noch unlösliche Bestandteile, so können diese in einem weiteren Schritt b) vorzugsweise über Aktivkohle und anschließend durch einen 0,45 µm Membranfilter abfiltriert werden.

Als Lipasesubstrat in Schritt c), dessen enzymatischer Abbau durch die in der Analysenprobe enthaltene Lipaseaktivität erfolgt, ist vorzugsweise ein Triglycerid zu verwenden. Bei diesem Substrat werden durch die Lipaseaktivität freie Carbonsäuren gebildet, die zu einer Änderung des pH-Wertes der Lösung in Schritt c) führen.

Die pH-Änderung führt zu einer Faränderung des einen Farbindikator enthaltenden Bestimmungsanztes, und das Ausmaß der Faränderung wird durch Messung der optischen Dichte der Lösung verfolgt.

Als besonders geeignete Lipasesubstrate können

Glycerintributyrat und Glycerintriolaur verwendet werden. Dabei beträgt die Konzentration des Lipasesubstrats bei der Bestimmung vorzugsweise 0,2 bis 2 Vol.-%; besonders bevorzugt ist eine Konzentration von 0,5 Vol.-% in dem Bestimmungsansatz. Als bevorzugter Farbindikator wird Lackmus verwendet. Bei der Verwendung von Lackmus erfolgt die photometrische Bestimmung in den Schritten d) und f) bei 600 nm.

Der Leerwert des Bestimmungsansatzes wird unmittelbar nach erfolgtem Zusatz des Lipasesubstrats und des Farbindikators zu der Extraktionslösung, enthaltend die Lipaseaktivität, durchgeführt.

Anschließend wird der Bestimmungsansatz, vorzugsweise bei 30 bis 45°C, besonders bevorzugt bei ungefähr 40°C, für vorzugsweise mindestens 2 h, besonders bevorzugt für ungefähr 20 h, inkubiert. Nach Inkubation wird die optische Dichte erneut bestimmt und aus der Differenz der optischen Dichten des Leerwerts und des nach Inkubation erhaltenen Werts anhand einer zuvor erstellten Eichkurve auf die Lipaseaktivität in dem Bestimmungsansatz geschlossen. Die Auswertung der Daten erfolgt auf herkömmliche Weise. Nach dem erfundungsgemäßen Verfahren kann somit eine qualitative und quantitative Bestimmung der Lipaseaktivität durchgeführt werden.

Ein besonders bevorzugtes Verfahren zur Bestimmung von Lipaseaktivität ist in Anspruch 26 ausgeführt.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfundung.

### 1. Materialien

#### a) Extraktionspuffer

Zunächst wurden 1000 ml einer Lösung hergestellt, indem in 500 ml destilliertem Wasser 4,98 g Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> × 10H<sub>2</sub>O (erhältlich von FLUKA AG, Schweiz) gelöst wurden. In weiteren 500 ml destilliertem Wasser wurden 1,71 g konzentrierte Salzsäure (32%) eingewogen, und anschließend wurden die beiden Lösungen von jeweils 500 ml unter kräftigem Rühen zusammengemischt. Zu 990 ml der so hergestellten Lösung wurden 10 ml Triton-X-100 unter Erwärmen der Lösung auf 50°C zugesetzt.

Alternativ zu der Kombination aus Natriumtetraborat und Salzsäure kann auch eine Kombination aus Borsäure, Kaliumchlorid und Natronlauge zur Herstellung des Extraktionspuffers verwendet werden.

#### b) Lipasesubstrat

Es kann 99%iges Glycerintriolaur oder Glycerintributyrat, beide erhältlich von FLUKA AG, Schweiz, verwendet werden.

#### c) Farbindikator

Pulverisiertes Lackmus, erhältlich von FLUKA AG, Schweiz.

#### d) Lipasepuffer

Zunächst wird eine zu dem Extraktionspuffer a) identische Lösung hergestellt, außer, daß kein Triton-X-100 zugesetzt wird. Zu 1000 ml dieser Lösung werden 15 ml einer 1%igen Lösung von Tween 80, einem nichtionischen Detergens, erhältlich von FLUKA AG, Schweiz, unter kräftigem Rühen bei ungefähr 50°C zugesetzt. Anschließend werden 10 ml des Lipasesubstrats Glycer-

intributyrat sowie 0,3 g Lackmus unter Erwärmen auf 80°C und unter kräftigem Rühen zugesetzt.

Zum Herstellen des Bestimmungsansatzes wird die so hergestellte Lösung mit der Extraktionslösung, umfassend den Extraktionspuffer a), und die extrahierten Lipasen, im Verhältnis 1 : 1 gemischt.

### 2. Lipaseaktivitätsbestimmung in verschiedenen Lebensmitteln

#### A) Erstellen einer Eichgeraden

Es wurden 6 ml Bestimmungsansätze hergestellt durch Zusatz definierter Mengen gewöhnlich erhältlicher Lipasen zu dem Lipasepuffer unter 1d). Der Bestimmungsansatz enthielt zwischen 0,5 und 60 Lipaseeinheiten, wobei 1 Lipaseeinheit der Enzymmenge entspricht, die 1 µmol/min Säure aus dem Substrat freisetzt. Die optische Dichte der so hergestellten Bestimmungsansätze wurde unmittelbar nach Zugabe der Lipase zu dem Lipasepuffer bei 600 nm bestimmt, und eine zweite Bestimmung erfolgte nach 20 h Inkubation bei 40°C. Die ermittelte Differenz der optischen Dichte aus den beiden Bestimmungen wurde gegen die in dem entsprechenden Bestimmungsansatz enthaltene Lipaseaktivität aufgetragen zum Erstellen der Eichkurve.

#### B) Bestimmung der Lipaseaktivität in verschiedenen Lebensmitteln

##### a) Lipaseaktivitätsbestimmung in schwarzem Pfeffer

0,053 g Pfeffer wurden in einem Erlenmeyerkolben eingewogen, und zu dieser Lebensmittelprobe wurden 30 ml Extraktionspuffer pipettiert. Dann wurde die Probe für 60 min bei 40°C im Brutschrank inkubiert und danach über 2 g Aktivkohle in einem Faltenfilter abfiltriert. Dann wurden 5 ml der filtrierten Lösung mit Hilfe einer Injektionspritze durch einen Membranfilter (Porodurchmesser 0,45 µm) filtriert. 3,0 ml des erhaltenen klaren Filtrats wurden mit 3,0 ml des Lipasesubstrat enthaltenden Puffers gemischt und kräftig geschüttelt. Die Absorption dieser Lösung betrug OD<sub>600</sub> = 0,312. Anschließend wurde der Bestimmungsansatz für 20 h bei 40°C inkubiert. Danach wurde erneut die Absorption bestimmt, die einen Wert von OD<sub>600</sub> = 0,323 ergab. Aus der Differenz von 0,011 ergab sich anhand der zuvor erstellten Eichkurve ein Gehalt der Probe an Lipaseaktivität von 24 Einheiten. Dies entspricht einem Gehalt von 44,1 Einheiten pro Gramm schwarzen Pfeffers.

##### b) Lipaseaktivitätsbestimmung in gemahlenem Curcuma

0,05 g gemahlenes Curcuma wurde wie unter a) analysiert. Es wurde ein Leerwert von OD<sub>600</sub> = 0,204 erhalten und nach 20 h Inkubation ein Wert von OD<sub>600</sub> = 0,231. Aus der Differenz von 0,027 ergibt sich eine Lipaseaktivität in der Probe von 5,7 Einheiten; dies entspricht einer Lipaseaktivität von 114,8 Einheiten pro Gramm Curcuma.

##### c) Majoran, gemahlen

0,05 g gemahlener Majoran wurden wie unter a) analysiert. Für den Leerwert ergab sich ein OD<sub>600</sub> = 0,39. Nach 20 h Inkubation betrug die OD<sub>600</sub> = 0,432. Aus der Differenz von 0,042 ergibt sich eine Lipaseaktivität in

der Probe von 10,1 Einheiten. Daraus folgt eine Lipaseaktivität von 202,5 Einheiten pro Gramm Majoran.

d) Rosmarin, gemahlen

0,05 g gemahlener Rosmarin wurden wie unter a) analysiert. Der Leerwert betrug  $OD_{600} = 0,266$ . Nach 20 h Inkubation betrug die  $OD_{600} = 0,346$ . Aus der Differenz von 0,08 ergibt sich eine Lipaseaktivität in der Probe von 35,8 Einheiten; daraus ergibt sich eine Lipaseaktivität von 715,5 Einheiten pro Gramm Rosmarin.

e) Thymian, gemahlen

0,05 g gemahlener Thymian wurden wie unter a) analysiert. Der Leerwert betrug  $OD_{600} = 0,316$ . Nach 20 h Inkubation betrug die  $OD_{600} = 0,349$ . Aus der Differenz von 0,033 ergibt sich eine Lipaseaktivität in der Probe von 7,0 Einheiten; daraus folgt eine Lipaseaktivität von 140,3 Einheiten pro Gramm Thymian.

In den obigen Beispielen wurde die Menge freigesetzter Carbonsäure in dem Bestimmungsansatz, die ein Maß für die in der Analysenprobe vorhandene Lipaseaktivität ist, ermittelt über die Änderung der optischen Dichte des Bestimmungsansatzes, die sich aus der Farbänderung des zugesetzten Katalysators durch die freigesetzte Säure ergibt. Es ist jedoch auch möglich, die freigesetzte Menge an Säure durch eine direkte Messung der Änderung des pH-Werts zu bestimmen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von Lipaseaktivität in Lebensmitteln, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Behandeln einer Lebensmittelprobe mit einer wässrigen Lösung einer Puffersubstanz mit pH 5 – 10, enthaltend ein nichtionisches Detergens, für mindestens 30 min bei 25 bis 50°C zum Extrahieren der Lipasen,
- b) gegebenenfalls Abfiltrieren des unlöslichen Extraktionsrückstands zum Herstellen einer klaren Lösung,
- c) Zusetzen eines Lipasesubstrats und eines Farbindikators zu der klaren Lösung aus Schritt a) bzw. b),
- d) Messen der optischen Dichte der in Schritt c) hergestellten Lösung bei einer auf den verwendeten Farbindikator abgestimmten Wellenlänge zum Ermitteln des Leerwerts,
- e) Inkubieren der in Schritt d) gemessenen Lösung bei 25 bis 50°C für mindestens 1 h zur Hydrolyse des in Schritt c) zugesetzten Substrats durch die in Schritt a) extrahierten Lipasen, und
- f) Messen der optischen Dichte wie in Schritt d) zum Ermitteln der Lipaseaktivität.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Puffersubstanz in Schritt a) ausgewählt wird aus den Natrium- und Kaliumsalzen von Phosphorsäure, Essigsäure, Tetaboratsäure sowie dem organischen Puffer Tris.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Puffersubstanz  $Na_2B_4O_7$  verwendet wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt a) eine wässrige Lösung mit einer Konzentration der Puffer-

substanz von 5 mM bis 100 mM verwendet wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß eine wässrige Lösung mit einer Konzentration der Puffersubstanz von 25 mM verwendet wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt a) eine wässrige Lösung mit pH 8 – 9 verwendet wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß eine wässrige Lösung mit pH 8,5 verwendet wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt a) eine wässrige Lösung mit einer Detergentskonzentration von 0,1 bis 5 Vol.-% verwendet wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß eine wässrige Lösung mit einer Detergentskonzentration von ungefähr 1 Vol.-% verwendet wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Detergens in Schritt a) ausgewählt wird aus Triton-X-100 und Tween 80.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als Detergens Triton-X-100 verwendet wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Lebensmittelprobe in Schritt a) ungefähr 1 h mit der wässrigen Lösung behandelt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Lebensmittelprobe in Schritt a) bei 30 bis 45°C mit der wässrigen Lösung behandelt wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Lebensmittelprobe bei ungefähr 40°C mit der wässrigen Lösung behandelt wird.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß der unlösliche Extraktionsrückstand in Schritt b) über Aktivkohle und anschließend einen 0,45 µm-Membranfilter abfiltriert wird.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß als Lipasesubstrat in Schritt c) ein Triglycerid verwendet wird.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Triglycerid ausgewählt wird aus Glycerintributyrat und Glycerintrioleat.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, daß ein Triglycerid in der Endkonzentration von 0,2 – 2 Vol.-% verwendet wird.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß ein Triglycerid in der Endkonzentration von 0,5 Vol.-% verwendet wird.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß als Farbindikator in Schritt c) Lackmus verwendet wird.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die optische Dichte in Schritt d) bei 600 nm gemessen wird, wenn Lackmus als Farbindikator verwendet wird.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt e) bei 30 bis 45°C inkubiert wird.

23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß bei ungefähr 40°C inkubiert wird.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23,

dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt e) die Lösung für mindestens 2 h inkubiert wird.

25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung ungefähr 20 h inkubiert wird.

26. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt a) die Lebensmittelprobe mit einer wäßrigen 25 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>/HCl-Lösung mit pH 8.5, enthaltend 1 Vol.-% Triton-X-100, für 1 h bei 40°C behandelt wird,

in Schritt b) der unlösliche Extraktionsrückstand durch Filtrieren über Aktivkohle und anschließend durch einen 0.45 µm-Membranfilter abfiltriert wird, in Schritt c) als Lipasesubstrat Glycerintributyrat mit einer Endkonzentration von 0.5 Vol.-% und als Farbindikator Lackmus zugesetzt wird, in Schritt d) die optische Dichte bei 600 nm gemessen wird, in Schritt e) bei 40°C für 20 h inkubiert wird und in Schritt f) die optische Dichte bei 600 nm gemessen wird.

5

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

— Leerseite —